

accumulation of the investigated enzymes in the area of the bacterial aggregations on the surface of plant roots.

СКРИНИНГ ШТАММОВ ИЗ РЕГИОНАЛЬНОЙ ПРОФИЛИРОВАННОЙ КОЛЛЕКЦИИ АЛКАНОТРОФНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ ПО УСТОЙЧИВОСТИ К ДЕЙСТВИЮ ОРГАНИЧЕСКИХ РАСТВОРИТЕЛЕЙ

О. Н. ПИСЦОВА, И. О. КОРШУНОВА

Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь
Пермский государственный национальный исследовательский университет
E-mail: kuyukina@iegm.ru, pistsova@gmail.com

Токсичное воздействие органических растворителей на бактериальные клетки приводит к повреждению клеточной оболочки. Актинобактерии рода *Rhodococcus* обладают высокой устойчивостью к углеводородным соединениям и являются актуальным объектом биотехнологических разработок по биотрансформации гидрофобных органических соединений и биоремедиации загрязненных углеводородами сред. Цель работы – выявление коллекционных штаммов родококков, устойчивых к действию органических растворителей, и изучение их морфологических особенностей.

В работе использованы 30 штаммов, принадлежащих к видам *Rhodococcus ruber*, *R. opacus*, *R. rhodochrous*, *R. erythropolis*, *R. fascians*, “*R. longus*”, из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (акроним ИЭГМ, WDCM # 768; www.iegm.ru/iegmcol). В качестве растворителей использовали *n*-гексан, *n*-декан, бутанол-1 и этанол. Инкубацию клеток родококков проводили в парах растворителя и в системе вода-растворитель в концентрации 20, 50 и 80%. Жизнеспособность бактерий определяли методом окрашивания йодонитротетразолия хлоридом (Sigma-Aldrich, США). Выращенные в МПБ и дважды отмытые натрий-фосфатным буфером клетки ресуспендировали в 100 мкл смеси буфер-растворитель до $ОП_{600} = 0,5$ и инкубировали при 28 °С, 1 сут на микропланшетном шейкере-инкубаторе Titramax 1000 (Heidolf-Instruments, Германия). $ОП_{620}$ окрашенной суспензии измеряли на микропланшетном фотометре Multiscan Ascent (Thermo Electron Corporation, Финляндия) с программным обеспечением Ascent Software v.2.6 (Thermo Labsystems, Финляндия). В качестве биотического контроля использовали суспензию клеток без добавления растворителя, в качестве абиотического контроля – чистый растворитель. Визуализацию клеток осуществляли с помощью атомно-силового микроскопа (АСМ) Asylum MFP-3D (Asylum Research, США) в полуконтактном режиме на воздухе с использованием кремниевого кантиливера AC240TS с резонансной частотой 50–90 кГц и постоянной жесткостью 0,5–4,4 Н/м. Определение размеров клеток проводили с помощью программы Igor Pro 6.22A (WaveMetrics, США).

По нашим данным, наиболее высокие показатели устойчивости к гидрофобным растворителям характерны для представителей видов *R. opacus* и *R. ruber*. Так, *R. opacus* ИЭГМ 57 и *R. ruber* ИЭГМ 235 демонстрировали двукратное повышение числа жизнеспособных клеток в присутствии 50 % *n*-гексана и *n*-декана, соответственно. Однако при взаимодействии с гидрофильными растворителями отмечено снижение жизнеспособности данных культур на 46 и 40 % в присут-

ствии 50 % бутанола-1 и этанола соответственно. Полученные данные подтверждаются коэффициентом токсичности данных растворителей, обратно пропорциональным показателю сроства растворителя к октану или воде $\log P_{ow}$ [2].

Выявлена зависимость показателей выживаемости родококков от концентрации органического растворителя. Так, при взаимодействии представителей *R. erythropolis* с *n*-деканом наблюдалось постепенное снижение жизнеспособности при повышении концентрации растворителя. Значительное ингибирование (от 30 до 70 %) роста *R. ruber*, *R. opacus*, *R. rhodochrous*, *R. fascians* наблюдалось лишь при 50 % растворителя, и в дальнейшем данный показатель существенно не изменялся. При взаимодействии с *n*-гексаном число живых клеток *R. opacus*, "*R. longus*", *R. erythropolis*, *R. ruber* плавно возрастало с повышением концентрации растворителя от 20 до 50 %, а в дальнейшем происходило снижение жизнеспособности. В присутствии бутанола наблюдалось значительное ингибирование роста всех исследуемых культур уже при 20 % концентрации, 60–80 % снижение жизнеспособности при 50 % и практически полная гибель клеток при 80 % растворителя. Аналогичные закономерности выявлены при воздействии на исследуемые культуры различных концентраций этанола.

Результаты АСМ-сканирования устойчивых к воздействию органических растворителей культур *R. opacus* и *R. ruber* свидетельствуют о том, что при взаимодействии с *n*-деканом, бутанолом и этанолом ширина клеток *R. ruber* ИЭГМ 235 увеличивалась на 0,53, 0,28 и 0,05 мкм соответственно при сохранении постоянной длины. При этом клетки данного штамма имели форму укороченных палочек, соответствующую стационарной фазе роста [1]. Клетки *R. opacus* ИЭГМ 57 в присутствии *n*-гексана имели характерную для экспоненциальной фазы роста форму удлинённых ветвящихся палочек [1] с пониженной на 0,46 мкм шириной по сравнению с контролем. Таким образом, исследуемые родококки демонстрируют различные морфологические приемы адаптации к воздействию органических растворителей.

Работа выполнена в рамках Государственного задания Минобрнауки России 6.1194.2014/К.

Литература

1. Ившина И. Б., Пшеничных Р. А., Оборин А. А. Пропанокисляющие родококки. Свердловск: УНЦ АН СССР, 1987. 125 с.
2. Carvalho Carla C. C. R. de. Adaptation of Rhodococcus to Organic Solvents // Biology of Rhodococcus / ed. H. Alvarez. Berlin: Springer-Verlag, 2010. P. 109–131.

SCREENING OF STRAINS OF REGIONAL SPECIALIZED COLLECTION ALKANOTROPHIC MICROORGANISMS TO RESISTANCE OF ORGANIC SOLVENTS

O. N. PISTSOVA, I. O. KORSHUNOVA

*Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms,
Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm
Perm State National Research University, Perm*

Summary. Bacterial tolerance and ability to adapt to organic solvents can be of valuable importance in biocatalytic and bioremediation processes. *Rhodococcus* strains have high resistant to hydrocarbon compounds. The studies have shown different ability

to survive and morphological characteristics of cells *Rhodococcus* after reaction with *n*-decane, *n*-hexane, 1-butanol and ethanol.

**ВЛИЯНИЕ ТЕХНОГЕННОГО ЗАСОЛЕНИЯ ПОЧВЫ НА
БАКТЕРИАЛЬНОЕ СООБЩЕСТВО РИЗОСФЕРЫ РАСТЕНИЙ
МЯТЛИКА ЛУГОВОГО (*POA PRATENSIS* L.), ПРОИЗРАСТАЮЩИХ
НА ТЕРРИТОРИИ СОЛЕРАЗРАБОТОК
(Г. СОЛИКАМСК, ПЕРМСКИЙ КРАЙ)**

А. А. Пьянкова, Е. С. Корсакова

Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь

E-mail: anprjankva@mail.ru, Catomille-08@mail.ru

На территории Пермского края при промышленной добыче и переработке солей Верхнекамского месторождения (ВКМ) на поверхности складированы отходы производства в шламохранилищах и галитовых отвалах, содержание хлорида натрия в которых составляет более 90 % [1]. Растворение материала отвалов и вынос солей приводит к засолению почвы, которое, как известно, оказывает сильное негативное действие на высшие растения. Однако к настоящему времени влияние техногенного засоления на ризосферные бактерии изучено недостаточно. Между тем бактерии ризосферы способны влиять на адаптацию ассоциированных с ними растений к стрессовым условиям, в том числе и к засолению [5].

Цель работы – изучение воздействия техногенного засоления на таксономическое разнообразие бактерий ризосферы растений вида мятлик луговой (*Poa pratensis* L.) на территории промышленных солеразработок ВКМ (г. Соликамск, Пермский край).

Для исследования были отобраны образцы ризосферы растений мятлика лугового (*Poa pratensis* L.), преобладающего в травяном покрове района разработок ВКМ. Пробы отбирали с участков с засоленной почвой в непосредственной близости от солеотвалов СКПРУ-1 и СКПРУ-2 предприятия ОАО «Уралкалий» (г. Соликамск, Пермский край). В качестве контроля были взяты образцы ризосферы растений мятлика лугового с участка без техногенного засоления вблизи Соликамска. Отбор, пробоподготовку и микробиологический анализ ризосферы растений проводили общепринятыми методами [3]. Общую минерализацию почвы определяли согласно [4]. Выделение и учет численности бактерий проводили на агаризованной среде LB [2], разведенной в пять раз, с добавлением NaCl в количестве 10 г/л. Филогенетический анализ полученных изолятов был основан на определении нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК с применением набора реактивов Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit на автоматическом секвенаторе Genetic Analyser 3500XL (Applied Biosystems, США). Полученные нуклеотидные последовательности длиной около 800 пн были проанализированы с использованием программ CLUSTAL W, Sequence Scanner v. 1.0. Поиск гомологичных последовательностей проводили в базе данных EzTaxon (<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon>).

Почвы, отобранные возле солеотвалов СКПРУ-1 и СКПРУ-2, имели повышенную минерализацию, составляющую 2,4 и 0,6 % соответственно. Контрольная незасоленная почва содержала 0,2 % солей.